Canadian Centre for Occupational Health and Safety

Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail

What is an LD_{50}?

P86-12E

87-02780/

Canadian Centre
for Occupational Health
and Safety

What is an LD_{50}?

by
- Sandra J. Bello
- David M. Halton
  Material Hazards

Canadian Centre
for Occupational Health
and Safety

WHAT IS AN LD_{50}?

CCOHS NUMBER P86-12E

ISBN 0-660-12154-9

DSS CATALOGUE NUMBER CC273-2/86-12E

This publication is available
in both official languages.

Cette publication est disponible
dans les deux langues officielles.

While the Centre endeavours to ensure the accuracy and completeness of information provided, it is understood that the Centre makes no warranty as to the accuracy or completeness of such information and assumes no liability for any damages or loss suffered as a result of any inaccuracy or incompleteness therein.

Published 1986

Additional copies available upon request.

250 Main Street East
Hamilton, Ontario
L8N 1H6
(416) 572-2981
Telex 061-8532

Canadian Centre
for Occupational Health
and Safety

CONTENTS

CONTENT	PAGE
Introduction	**1**
How is the LD_{50} performed?	**1**
The oral LD_{50}	2
Other types of LD_{50}	4
The LC_{50}	5
What does the LD_{50} value tell us and how is the LD_{50} used?	5
The future of the LD_{50}	**8**
Summary	**9**
Appendix	**9**
Selected Bibliography	**10**

Introduction

How can we measure the toxicity of a chemical? Logically, we must choose some toxic effect and measure how much of the chemical causes this effect. But which toxic effect should we choose? We could measure, for example, how much of a chemical causes kidney damage or nerve damage, but not all chemicals will damage these systems. Since different chemicals cause different toxic effects, it is hard to compare the toxicity of one with another. We can say that 10 grams of chemical A causes nerve damage and 20 grams of chemical B causes kidney damage, but it does not tell us which of A or B is more toxic. To put it another way, in order to make a comparison between A and B, the response, effect, or damage that we measure must be the same. The only response that is the same for overexposure to all chemicals is death. Toxicology testing which measures the death of test animals exposed to chemicals is called lethality testing.

In 1927, J.W. Trevan attempted to find a way to estimate the relative poisoning potency of drugs and medicines used at that time[1]. He developed a test known as the LD_{50} (lethal dose 50). This is the dose of a chemical which kills one half (50 %) of the animals tested. This use of death as the measured response allowed for comparisons between chemicals which poison the body in very different ways.

Trevan felt that 30 animals were needed for each dose of chemical tested for the LD_{50} to be accurate. This meant that the total number of animals used for each LD_{50} study could be extremely large. Since Trevan's early work, other scientists have developed different approaches for more direct, faster methods of obtaining the LD_{50}[2,3].

These newer techniques have reduced the number of animals used. Despite these changes, the basic methods for performing the LD_{50} are essentially the same.

How is the LD_{50} Performed?

In nearly all cases, LD_{50} s are performed using single test chemicals. Rarely are mixtures studied.

The chemical may be given to the animals by mouth (oral administration); by painting on the skin (skin or dermal application); by injection at sites such as the blood veins (I.V. (intravenous)), or muscles (I.M. (intramuscular)); or even by insertion into the rectum. The LD_{50} value obtained at the end of the experiment is identified as the LD_{50} (oral), LD_{50} (skin or dermal) or LD_{50} (I.V.), as appropriate. The test may be done with any animal species but most often rats or mice are used. In addition, dogs, hamsters, cats, guinea-pigs, rabbits, monkeys and mini-swine are used. In each case, the LD_{50} value obtained would be further identified as LD_{50} (oral, rat), LD_{50} (skin, rabbit) and so on.

If the effects of breathing a compound are to be tested, then the chemical is first mixed into the air which the test animals breathe.

How is the LD_{50} performed? *continued*

In this special case, the result obtained is called an LC_{50} (Lethal Concentration 50) rather than an LD_{50}.

Of all the different types of lethality measurements, the most relevant from the occupational exposure viewpoint are the inhalation and skin application tests. Inhalation and skin absorption are the most common routes by which workplace chemicals enter the body[4]. Despite this fact, the most frequently performed lethality study is the oral LD_{50}. This is because giving chemicals to animals by mouth is much easier and less expensive than other techniques. The results of oral studies are important for drugs, food poisonings, accidental domestic poisonings and occupational poisonings that might occur through contamination of food or cigarettes from unwashed hands.

The First Step: Range-Finding

A mini-study is done to estimate the potency of the chemical being tested. This test is called a range-finding study. Doses ranging from very low to very high are given to a few rats or mice (usually two animals per dose) in order to measure their sensitivity to the test chemical. Doses are nearly always given in terms of the number of milligrams or grams of a chemical which is given for each gram or kilogram of the animal's body weight. For example, if we wish to give a dose of 20 milligrams per kilogram body weight (mg/kg b.w.) to an animal weighing 5 kilograms, we would have to give the animal a total of 100 milligrams of the chemical. Range-finding is done for all LD_{50} studies no matter what the route of exposure.

The oral LD_{50}

After the range-finding study has estimated the concentrations of the chemical which can kill between 10 and 90% of the animals, the actual oral LD_{50} measurement can begin. The exact number of doses and the number of animals used in each LD_{50} study may vary considerably with the specific investigation. For example, let us suppose that 60 animals are used and are split up into 6 different groups, each group containing 5 males and 5 females (Figure 1). These 6 different groups would then be given 6 different doses of the test chemical at, or around, the range determined in the range-finding study.

Figure 1

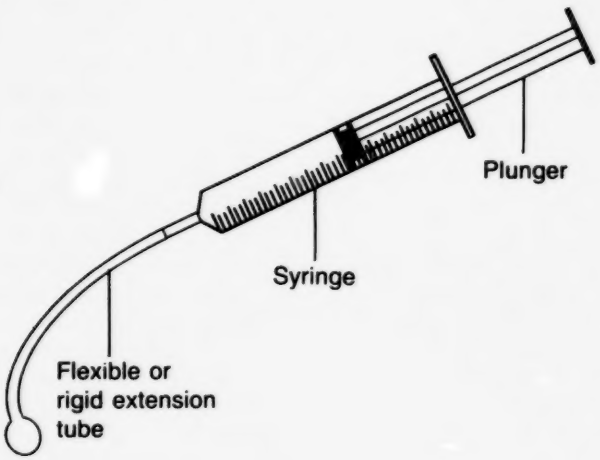
Results which may appear in an oral LD_{50} test (plotted in figure 4)

Dose Group	No. of Animals	Dose Given mg/kg Bd. wt.	Rats Died 24 Hours
1	10	1	0
2	10	2	1
3	10	3	2
4	10	4	8
5	10	5	9
6	10	6	10

The Oral LD_{50} *continued*

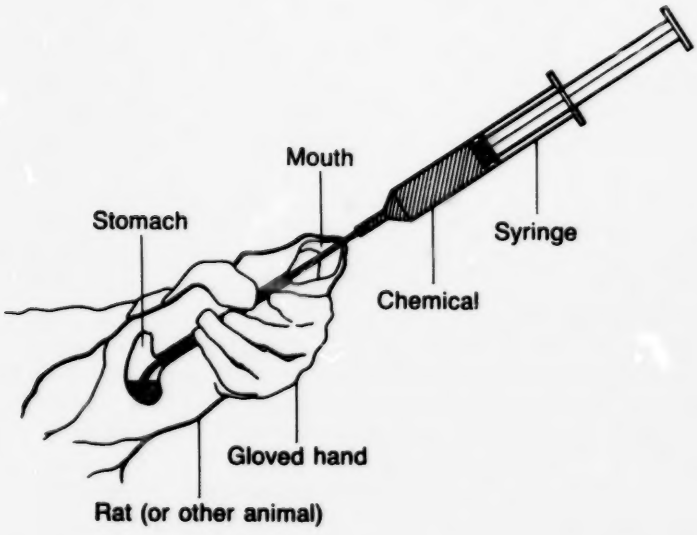
The chemical is usually given to the animal by using a syringe with a long tube. This long tube can be rigid or flexible and it usually has a small bulb at one end (Figure 2).

Figure 2 Syringe system used in the LD_{50} test



The tube is placed into the mouth of the test animal and is pushed down the throat into the stomach. At this point, the scientist pushes the plunger on the syringe and the chemical enters the stomach (Figure 3).

Figure 3 Test chemical deposited in animals stomach

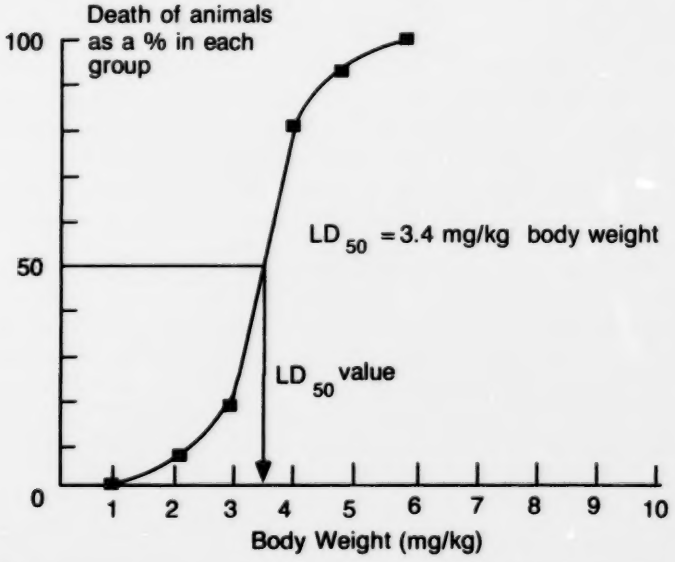


The Oral LD_{50} *continued*

Over the next few hours, the animals are watched closely for signs of poisoning. By observing how the animal is affected, important clues can be obtained as to how the chemical acts upon the body. Staggering suggests an effect on the nervous system; blood in the urine may indicate kidney damage; difficulty in breathing may indicate an effect on the lungs. Usually, the number of animals which die in the first 24 hours after treatment is used to calculate the LD_{50} value. Generally, animals are observed for 14 days after dosing. Those showing effects from which they are unlikely to recover may be removed and killed before the end of the experiment. Normally, after 14 days, scientists kill all the remaining animals and examine the internal organs for damage so that they can learn as much as possible about how the test chemical affects the animal.

A graph showing the percentage of animals that died within the first 24 hours compared to the dose given usually shows an S-shaped curve from which the LD_{50} can be calculated (Figure 4). This is a very simple form of analysis. In the real testing situation a variety of more accurate graphical or mathematical analyses may be used.

Figure 4 Data from LD_{50} test



Data from the LD_{50} results in figure 1 are plotted to give an S-shaped curve. This shows a simple way of obtaining an LD_{50} value.

Other types of LD_{50}

LD_{50} s for the skin or for injection at various sites are performed in exactly the same way as the oral LD_{50}, except for the route of entry into the body. In a skin LD_{50} test, the back of an animal, usually a rat, mouse or rabbit, is shaved; known concentrations of the chemical are painted onto the exposed skin. For LD_{50}s obtained by injection,

Other types of LD_{50} *continued*

the chemical is injected at a predetermined site in the body.

The animals are observed and the data analysed in exactly the same way as for the oral LD_{50}.

The LC_{50}

Tests in which chemicals are breathed are a special kind of lethality test. For the LC_{50}, the amount of chemical to which the animal is exposed is not given in terms of the animal's body weight, but in terms of the concentration of the test chemical in the air around the animal. This concentration is usually quoted as parts per million (ppm) or milligrams per cubic metre (mg/m^3).

During an LC_{50} experiment, the animals are placed in special rooms or enclosures for a specific period of time (usually 4 hours). The test chemical is mixed with the incoming air supply and is maintained at a constant concentration. In some animal enclosures there is the danger that the chemical may not circulate evenly and may form areas of high or low concentrations. Several special types of containers and chambers have been developed to avoid this problem. The results and data are analysed in the same manner as for the oral LD_{50}.

What does the LD_{50} value tell us and how is it used?

The LD_{50} gives a comparative indication of the immediate (acute) toxicity of a chemical in a strain, sex or age group of a particular animal species*. Changing any of these variables could change the LD_{50} value. The LD_{50} test was neither designed nor intended to give information on long-term exposure effects of a chemical.

Once an LD_{50} value has been determined, it can be interpreted using a graded scale which gives us some indication of the chemical's *relative* toxicity. Confusion about this step sometimes occurs because a number of different toxicity scales are in use for short-term (acute) exposures.

The two scales which often appear in occupational toxicology assessments are the Hodge and Sterner Scale (Table 1)[5] and the Gosselin, Smith and Hodge Scale (Table 2)[6]. These two tables differ both in the numerical rating given to each toxicity class and the terms used to describe each toxicity class. For example, an "extremely toxic" chemical is rated as "1" in Table 1 whereas it is rated as "5" in Table 2. If a chemical has an oral LD_{50} value of 2 mg/kg, it would be rated as "1" and "highly toxic" according to Table 1 but rated as "6" and "super toxic" according to Table 2. It is, therefore, important to refer to the scale being used when quoting a compound as being slightly toxic, moderately toxic or extremely toxic.

* In its strictest interpretation, it allows only the comparison of the toxicity of one chemical relative to other chemicals tested in the same way in the same species (strain, age, sex).

What does the LD_{50} value tell us and how is it used? *continued*

The smaller the value of the LD_{50}, the more toxic is the chemical. Conversely, the larger the LD_{50} value, the lower the toxicity. An important point to note is that the actual LD_{50} value may be different for a given chemical depending on the route of exposure (e.g. oral, dermal, inhalation). Let us look at the LD_{50} values for dichlorvos, an insecticide commonly used in household pesticide strips. Here are six different lethality test data for dichlorvos[7]:

- Oral LD_{50} (rat): 56 mg/kg
- Oral LD_{50} (mouse): 135 mg/kg
- Oral LD_{50} (dog): 1,090 mg/kg
- Dermal LD_{50} (rat): 75 mg/kg
- Dermal LD_{50} (rabbit): 107 mg/kg
- Inhalation LC_{50} (rat): 1.7 ppm (15 mg/m^3); 4-hour exposure

Using the Tables of Toxicity Classes, Table 1 shows that in the rat, dichlorvos is moderately toxic when swallowed (oral LD_{50}) and extremely toxic when breathed (inhalation LC_{50}). Differences in the LD_{50} toxicity ratings reflect the different routes of exposure.

The toxicity rating also changes for different animals. From the data given above, dichorvos is much less toxic by ingestion in dogs than in mice or rats.

How can such LD_{50} data be applied to man? Scientists have learned from routine LD_{50} studies that, in general, if the immediate toxicity of a chemical is similar for all the different animals tested, then the degree of immediate toxicity will probably be similar for humans[8,9]. When the LD_{50} values are different or when animal data are lacking, approximations and assumptions must be made to estimate the probable lethal dose for man. Tables 1 and 2 have a column for estimated lethal doses in man. Special calculations are used to translate animal LD_{50} values to probable lethal dose value for humans. Safety factors of 10,000 or 1000 are usually included in such calculations to allow for individual variabilities in reacting to a chemical and for the uncertainties of experiment test results.

Table 1

Toxicity Classes
Hodge and Sterner Scale[5]

		Routes of Administration			
Toxicity rating	Commonly used term	Oral LD_{50} (Single dose to rats) mg/kg	Inhalation LC_{50} (Exposure of rats for 4 hours) ppm	Dermal LD_{50} (Single application to skin of rabbits mg/kg	Probable lethal dose for man
1	Extremely toxic	1 or less	10	5 or less	1 grain (a taste, a drop)
2	Highly toxic	1-50	10-100	5-43	4 ml (1 tsp-ful)
3	Moderately toxic	50-500	100-1000	44-340	30 ml (1 fl. oz.)
4	Slightly toxic	500-5000	1000-10,000	350-2810	600 ml (1 pint)
5	Practically non-toxic	5000-15,000	10,000-100,000	2820-22,590	1 litre (or 1 qt.)
6	Relatively harmless	15,000 or more	100,000	22,600 or more	1 litre (or 1 qt.)

Table 2

Toxicity Classes
Gosselin, Smith and Hodge[6]

	Probable Oral LETHAL Dose (Human)	
Toxicity Rating or Class	Dose	For 70-kg. person (150 lbs.)
6 Super toxic	Less than 5 mg/kg	1 grain (a taste - less than 7 drops)
5 Extremely toxic	5-50 mg/kg	4 ml (between 7 drops and 1 tsp.)
4 Very toxic	50-500 mg/kg	30 ml (between 1 tsp. and 1 fl. ounce)
3 Moderately toxic	0.5-5 gm/kg	30-600 ml (between 1 fl oz. and 1 pint)
2 Slightly toxic	5-15 gm/kg	600-1200 ml (between 1 pt. and 1 quart)
1 Practically non-toxic	Above 15 gm/kg	More than 1200 ml (more than 1 quart)

What does the LD_{50} value tell us and how is it used? *continued*

Since the LD_{50} is a test which provides information on the short-term toxicity of a chemical, it can be used:

1. As an aid in developing the kinds of emergency procedures which might be necessary in instances of a major spill or accident.

2. To help develop guidelines for the use of appropriate safety clothing and equipment. For example, if the dermal LD_{50} value for a chemical is rated as extremely toxic, it is important to protect the skin with clothing or gloves, made of resistant material. Alternatively, if a chemical has an inhalation LC_{50} value which indicates that it is relatively harmless, then respiratory protective equipment may not be necessary during handling.

3. For the development of transportation regulations, based on factors 1 and 2 above.

4. As an aid in establishing occupational exposure limits.

5. As a part of the information in Material Safety Data Sheets. For this use, the LD_{50} is only a ball park figure of comparative toxicity. It says nothing about the levels at which toxic, but non-lethal, effects might occur through the use of a product.

The LD_{50} is only one source of toxicity information. For a more complete picture of a chemical's immediate toxicity, additional information should be considered such as the lowest dose which causes a toxic effect, the rate of recovery from a toxic effect and the possibility that exposure to some chemical mixtures may result in increasing their toxicity.

The future of the LD_{50}

Because of their use and application in various regulations and guidelines, lethal dose values (LD_{50}, LC_{50}) are widely quoted and are considered an important part of a chemical's immediate toxicity. Despite their use, scientists criticize lethality tests for several reasons. The tests may use a large number of animals[10,11]; the results are not easily reproduced in different laboratories[12,13]; and, the cause of death could differ depending on the dose, length and frequency of exposure. Finally, they represent only one aspect of a chemical's toxicity[10,11,14,15].

Alternative approaches to testing have been suggested in an attempt to provide more useful information on a chemical's toxicity and to reduce the number of animals used. Variations of the LD_{50} test such as changing the number of animals used or changing the dose procedure are possibilities[11,12,16]. Computer modelling systems and experiments on animal or human cells to test the toxicity of chemicals have been tried[11]. Another approach is to give doses to animals to observe toxic effects instead of deliberately causing death[11].

Summary

It seems unlikely that any of the new approaches will totally replace the LD_{50}. The LD_{50} has, by its usage over the last 50 years, gained a considerable following. It now forms part of the required basic evaluation data in a large number of chemical toxicity summaries.

It has been adopted internationally into legislation covering occupational health, environment, chemical transportation and chemical registration. At this stage, it would be a sizeable task to change these administrative structures, and it is likely that the LD_{50}, despite its shortcomings, will continue to be used for many years. It is hoped that its future use will be moderated by the knowledge of its limitations and by the recognition of its place only as a small and, perhaps, not the most useful measure of a chemical's toxicity. Other signs of toxicity such as sickness at low-dose levels should assume a greater importance.

Appendix

Some other toxicity dose terms in common usage

LD_{01}	Lethal dose for 1% of the animal test population
LD_{100}	Lethal dose for 100% of the animal test population
LD_{LO}	The lowest dose causing lethality
TD_{LO}	The lowest dose causing a toxic effect

SELECTED BIBLIOGRAPHY

1. Trevan, J.W. The error of determination of toxicity. Proceedings of the Royal Society of London : Series B : biological sciences. Vol. 101 (1927). p. 483-514

2. Bliss, C.L. The calculation of the dose-mortality curve. Annals of Applied Biology. Vol. 22 (1935). p. 134-167

3. Litchfield, J.T.; Wilcoxon, F. Simplified method of evaluating dose-effect experiments. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Vol. 96 (1949). p. 99-113

4. Halton, D.M. How workplace chemicals enter the body (P85 - 6E). Hamilton, Ontario: CCOHS, 1985

5. Deichmann, W.B.; Gerarde, H.W. Toxicology of drugs and chemicals. New York : Academic Press, 1969

6. Gosselin, R.E.; Smith, R.P.; Hodge, H.C. Clinical toxicology of commercial products. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984

7. Registry of toxic effects of chemical substances. NIOSH Cincinnati, OH: Vol. 2 (1979). p. 276

8. Ottoboni, M.A. The dose makes the poison : a plain language guide to toxicology. Berkely, CA: Vincente Books, 1984

9. Society of Toxicology of Canada. Position paper on the LD_{50}. Adopted at the STC Annual Meeting, December 3, 1985

10. Zbinden, G.; Flury-Roversi, M. Significance of the LD_{50}-test for the toxicological evaluation of chemical substances. Archives of Toxicology. Vol. 47 (1981). p. 77-99

11. Special Report: A new approach to the classification of substances and preparation on the basis of their acute toxicity. A report by the British Toxicology Society Working Party on Toxicity. Human Toxicology. Vol. 3 (1984). p. 85-92

12. Schültz, E.; Fuchs, H. A new approach to minimizing the number of animals used in acute toxicity testing and optimizing the information of test results. Archives of Toxicology. Vol. 51 (1982). p. 197-220

13. Blass, R.; Günzel, P.; Henschler, D.; König, J.; Lorke, D.; Neubert, D.; Schültz, E.; Shchuppan, D.; Zbinden, G. LD_{50} versus acute toxicity. Archives of Toxicology. Vol. 51 (1982). p. 183-186

14. Sperling, F. Non-lethal parameters as indices of acute toxicity : inadequacy of the acute LD_{50}. In: Advances in Modern Toxicology. Vol. 1, part 1. New concepts in safety evaluation. Eds. Mehlman, M; Shapiro, R.; Blumenthal, H. Halsted Press. John Wiley and Son, 1982. p. 177-191

15. Zbinden, G. Acute toxicity. In: Progress in Toxicology - Special topics. Vol. 1. New York : Springer, 1973. p. 23-27

16. Müller, H.; Kley, H.P. Retrospective study on the reliability of an "approximate LD_{50}" determined with a small number of animals. Archives of Toxicology. Vol. 51 (1982). p. 188-196

Canadian Centre for
Occupational Health
and Safety

Centre canadien
d'hygiène et de
sécurité au travail

Qu'est-ce que la DL_{50}?

P86-12F

Qu'est-ce que la DL_{50}?

par

- Sandra J. Bello
- David M. Holton
  Substances dangereuses

QU'EST-CE QUE LA DL_{50}?

NUMÉRO DU CCHST P86-12F

ISBN 0-660-91803-X

NUMÉRO DE CATALOGUE DSS CC273-2/86-12F

This publication is available
in both official languages.

Cette publication est disponible
dans les deux langues officielles.

Le Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail s'efforce de s'assurer que l'information qu'il distribue est exacte et exhaustive. Cependant is est entendu que le Centre ne se porte pas garant que ladite information est exacte et exhaustive et ne sera responsable d'aucun dommage ni d'aucune perte subis par le demandeur par suite de l'utilisation d'une information inexacte ou incomplète.

Publié 1986

Exemplaires supplémentaires disponibles sur demande.

250 rue Main Est
Hamilton Ontario
Canada
L8N 1H6
(416) 572-2981
Télex 061-8532

Centre canadien
d'hygiène et de
sécurité au travail

TABLE DES MATIÈRES

SECTION	PAGE
Introduction	**1**
Description de la DL_{50}	**2**
La DL_{50} orale	3
Autres types de DL_{50}	6
La CL_{50}	6
L'interprétation et l'application des résultats de la DL_{50}	6
L'avenir de la DL_{50}	**10**
Sommaire	**11**
Annexe	**11**
Bibliographie	**13**

Introduction

Comment peut-on mesurer la toxicité d'un produit chimique? Logiquement, on doit choisir un effet toxique donné et mesurer la quantité de produit chimique qu'il faut pour produire cet effet. Mais encore faut-il déterminer l'effet toxique approprié. Ainsi, on peut mesurer la quantité de produit chimique qui provoque des lésions aux reins ou au système nerveux. Cependant, les produits chimiques ne s'attaquent pas tous aux mêmes organes et systèmes. Puisque les effets toxiques varient d'un produit chimique à l'autre, il est difficile d'établir un critère universel pour comparer la toxicité des produits entre eux. Même si l'on sait que 6 grammes du produit chimique A provoquent des lésions au système nerveux et que 20 grammes du produit chimique B causent des lésions aux reins, ces renseignements ne suffisent pas pour déterminer lequel des deux est le plus toxique. En d'autres termes, pour comparer correctement les produits chimiques A et B, on doit pouvoir se fonder sur la mesure de la même réaction, du même effet ou des mêmes lésions. Or la seule réaction de l'organisme qui soit la même pour tous les produits chimiques en dose suffisante, c'est la mort. On désigne du nom d'épreuve de létalité les épreuves toxicologiques qui permettent de mesurer la mortalité chez des animaux d'expérience exposés à des produits chimiques.

En 1927, J.W. Trevan a essayé de mettre au point une méthode qui permettrait d'estimer la puissance toxique relative des différents médicaments et drogues employés à l'époque[1]. Il a élaboré une épreuve que l'on désigne par l'abréviation DL_{50} (dose létale 50 ou médiane). Il s'agit de la dose du produit chimique qui tue la moitié (50 pour cent) des animaux mis en expérimentation. En se fondant sur la mortalité comme critère de mesure, on a pu comparer les produits chimiques ayant des effets toxiques très différents sur l'organisme.

Selon M. Trevan, pour que la DL_{50} produise des résultats valables, il fallait expérimenter sur une population de 30 animaux pour chaque dose de produit chimique. En conséquence, on tendait à utiliser un nombre très élevé d'animaux d'expérience pour mener chaque étude de DL_{50}. Depuis les travaux de M. Trevan, d'autres chercheurs ont élaboré des approches différentes qui utilisent des méthodes plus rapides et plus directes pour effectuer l'épreuve DL_{50}[2,3].

Ces techniques plus récentes permettent de réduire le nombre d'animaux mis en expérimentation. Malgré ces améliorations, les méthodes fondamentales pour déterminer la DL_{50} demeurent essentiellement les mêmes.

Description de la DL_{50}

Dans la plupart des cas, l'épreuve DL_{50} ne porte que sur un produit chimique pris isolément. Il est rare qu'on étudie des mélanges.

Le produit chimique peut être administré aux animaux de différentes manières: en l'insérant directement dans les voies digestives (par voie orale); en le badigeonnant sur la peau (application sur la peau ou dermique); en l'injectant soit dans le système circulatoire (I.V. (par voie intraveineuse)), soit dans les muscles (I.M. (par voie intramusculaire)); ou même par voie rectale. On désigne la valeur de la DL_{50} obtenue à la fin de l'expérience selon le mode d'administration choisi: DL_{50} (orale), DL_{50} (dermique) ou DL_{50} (I.V.). Pour mener l'expérience, on utilise la plupart du temps des rats ou des souris bien que l'on puisse se servir d'animaux de n'importe quelle autre espèce. Ainsi, on utilise également des chiens, des hamsters, des chats, des cobayes, des lapins, des singes et des cochons nains. Dans ce cas, les valeurs de la DL_{50} sont annotées en conséquence: DL_{50} (orale, rat), DL_{50} (dermique, lapin) et ainsi de suite.

Si l'on veut étudier les effets de l'inhalation d'un produit chimique par les voies respiratoires, on le mélange d'abord à l'air ambiant que respirent les animaux d'expérience. Pour cette expérience spéciale, on désigne les résultats par CL_{50} (concentration létale 50 ou médiane) plutôt que par l'expression DL_{50}.

Parmi les différents types de mesure de la létalité, les plus pertinentes pour l'étude des risques professionnels sont les études qui portent sur l'inhalation et l'application dermique. En effet, dans la plupart des cas, les produits chimiques qui se trouvent dans les lieux de travail s'introduisent dans l'organisme soit par inhalation, soit par contact avec la peau[4]. Néanmoins, la DL_{50} orale demeure l'étude de létalité la plus répandue. On préfère administrer les produits chimiques aux animaux par voie orale parce que cette technique est plus facile à exécuter et moins coûteuse que les autres. Les résultats des études toxicologiques par voie orale s'appliquent à l'ingestion de drogues, aux empoisonnements alimentaires, aux empoisonnements accidentels à la maison ainsi qu'aux empoisonnements dans le milieu de travail qui peuvent survenir par contamination des aliments ou des cigarettes lorsqu'on manipule ceux-ci sans s'être lavé les mains au préalable.

La première étape: définition de l'étendue du dosage

On effectue d'abord une étude préliminaire pour estimer la puissance du produit chimique que l'on désire étudier. Cette première épreuve a pour but de définir l'étendue des doses qui seront utilisées. On administre à quelques rats ou souris (habituellement deux animaux par dose) des doses dont la puissance varie de très faible à très forte de manière à déterminer leur sensibilité au produit chimique à l'étude. Dans presque tous les cas, on calcule la dose en fonction du poids de l'animal, la dose du produit chimique étant exprimée en milligrammes ou en grammes et le poids corporel de l'animal en grammes ou

La première étape: définition de l'étendue du dosage *suite*

en kilogrammes. Par exemple, si l'on désire administrer une dose de 20 ml par kg de poids corporel (ml/kg p.c.) à un animal qui pèse 5 kg, la dose totale du produit chimique sera de 100 milligrammes. On procède à des épreuves préliminaires pour toutes les études de la DL_{50} quel que soit le mode d'administration du produit chimique.

La DL_{50} orale

Après avoir déterminé au moyen d'épreuves préliminaires, les concentrations de produits chimiques qui tuent entre 10 et 90 pour cent des animaux d'expérience, on peut entreprendre l'étude de DL_{50} proprement dite. Le nombre exact de doses ainsi que le nombre d'animaux employés dans chaque étude de DL_{50} peut varier beaucoup d'une étude à l'autre. Prenons comme exemple une étude dans laquelle on répartit 60 animaux en six groupes différents, comprenant chacun cinq mâles et cinq femelles (Figure 1). On administre ensuite à chacun de ces groupes une dose distincte du produit chimique à l'étude en se fondant sur l'étendue déterminée au cours de l'étude préliminaire.

Figure 1

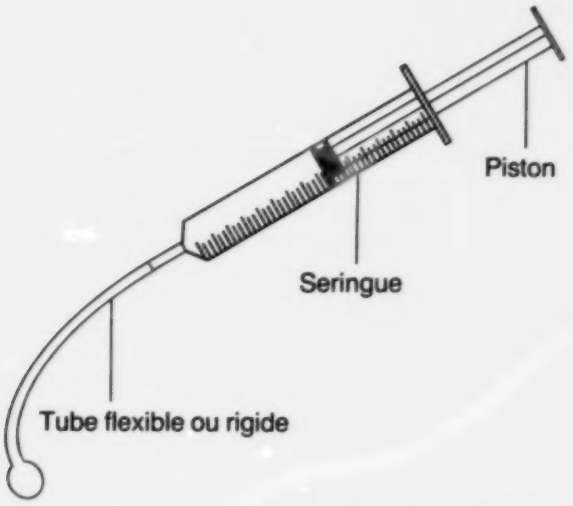
Exemple de résultats représentatifs d'une épreuve DL_{50} orale (les résultats sont reportés sur la courbe de la Figure 4)

Groupe	Nombre d'animaux	Dose administrée mg/kg poids corporel	Rats morts en 24 heures
1	10	1	0
2	10	2	1
3	10	3	2
4	10	4	8
5	10	5	9
6	10	6	10

On administre habituellement le produit chimique à l'aide d'une seringue munie d'un long tube. Ce tube peut être rigide ou flexible et se termine habituellement par un petit bulbe à l'une des extrémités (voir la Figure 2).

Figure 2

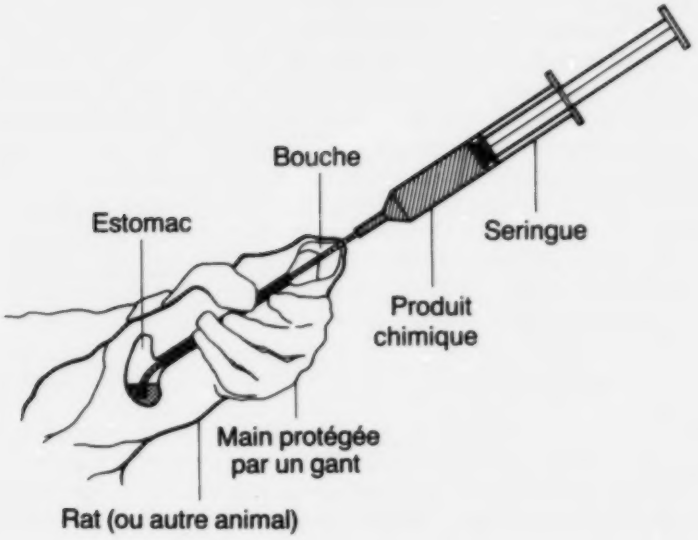
Système de gavage utilisé pour administrer les produits chimiques aux animaux pour l'épreuve de DL_{50} orale



On insère le tube dans la gueule de l'animal et on l'enfonce dans l'oesophage jusqu'au niveau de l'estomac. Le chercheur appuie ensuite sur la seringue pour faire pénétrer le produit chimique dans l'estomac de l'animal (voir la Figure 3).

Figure 3

Le produit chimique est déposé dans l'estomac des animaux au début de l'épreuve DL_{50} orale.



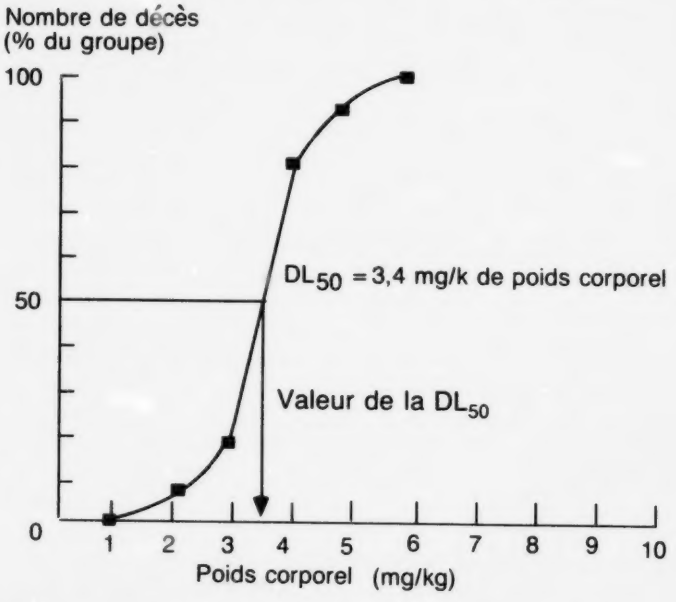
La DL_{50} orale
suite

Au cours des heures qui suivent, on surveille les animaux de près pour déceler les signes d'empoisonnement. En observant les modifications du comportement animal, on recueille des indices précieux quant à la nature des effets du produit chimique sur l'organisme. Les troubles de l'équilibre indique que le produit chimique agit sur le système nerveux; les traces de sang dans l'urine peuvent correspondre à des lésions rénales; la détresse respiratoire peut signifier que le poison agit sur les poumons. Habituellement, on calcule la valeur de la DL_{50} à partir du nombre d'animaux qui meurent au cours des 24 heures qui suivent l'administration du produit chimique. Règle générale, on continue d'observer les animaux pour une période de 14 jours. Les animaux qui présentent des symptômes dont ils ne récupéreront vraisemblablement pas peuvent être enlevés et euthanasiés avant la fin de l'expérience. Normalement, 14 jours après le début de l'expérience, les chercheurs tuent tous les animaux qui sont encore en vie. Ils examinent les organes internes pour déceler des lésions et accumuler le plus de données possibles sur les effets que le produit chimique a pu avoir sur l'animal.

La courbe du pourcentage des animaux qui meurent au cours des 24 premières heures en fonction de la dose du produit chimique qui leur a été administré prend habituellement la forme d'un S et permet de calculer la valeur de la DL_{50} (voir la Figure 4). C'est une analyse extrêmement simple. Dans le contexte d'une épreuve réelle, on a recours à plusieurs analyses graphiques et mathématiques plus exactes.

Figure 4

Résultats de la DL_{50}



La courbe représentant les valeurs données à la Figure 1 prend la forme d'un S. C'est une technique simple pour calculer la valeur de la DL_{50}.

Autres types de DL_{50}

La procédure expérimentale à suivre pour les DL_{50} dermique, I.V. ou I.M., est identique à celle de la DL_{50} orale, exception faite de la façon dont le produit chimique pénètre dans l'organisme. Pour effectuer une épreuve DL_{50} dermique, on rase les poils sur le dos de l'animal — en principe, un rat, une souris ou un lapin — et on applique une concentration connue du produit chimique sur la peau. Pour ce qui est de la DL_{50} intraveineuse ou intramusculaire, on injecte le produit chimique dans un endroit prédéterminé sur le corps de l'animal.

Les modalités d'observation et l'analyse des données sont effectuées exactement de la même manière que pour la DL_{50} orale.

La CL_{50}

La CL_{50} est une épreuve de létalité spéciale dans laquelle les produits chimiques sont ingérés par inhalation. Pour cette épreuve, la quantité du produit chimique auquel on expose l'animal est exprimée non pas en fonction du poids corporel mais en fonction de la concentration du produit chimique dans l'air ambiant. La concentration est ainsi habituellement exprimée en parties par million (ppm) ou milligrammes par mètre cube (mg/m^3).

Pour l'épreuve CL_{50} on place les animaux dans des enceintes spéciales pour une période de temps déterminée (habituellement 4 heures). Le produit chimique est mélangé à l'apport d'air frais et la concentration reste uniforme. Dans certaines enceintes, la concentration du produit chimique risque de varier en raison d'une mauvaise circulation d'air de sorte qu'il peut y avoir des zones de faibles et de fortes concentrations. Pour éviter ce problème, on a mis au point plusieurs types différents d'enceintes et de contenants. Les résultats et les données sont analysés de la même manière que pour la DL_{50} orale.

L'interprétation et l'application des résultats de la DL_{50}

La DL_{50} est un indice comparatif de la toxicité immédiate (aiguë) d'un produit chimique en fonction de la race, du sexe ou du groupe d'âge d'une espèce animale en particulier*. Tout changement dans l'une de ces variables peut modifier la valeur de la DL_{50}. La nature et l'objectif de l'épreuve de la DL_{50} ne permettent pas de tirer des conclusions sur les effets du contact prolongé avec un produit chimique.

* Selon l'interprétation la plus rigoureuse, la DL_{50} permet de comparer la toxicité d'un produit chimique donné avec celle d'autres produits chimiques analysés de la même manière au moyen de la même espèce (mêmes race, tranche d'âge et sexe).

L'interprétation et l'application *suite*

Après avoir déterminé la valeur de la DL_{50}, on peut interpréter la toxicité *relative* du produit chimique analysé à l'aide d'une échelle graduée. Ce calcul prête parfois à confusion parce qu'il existe plusieurs échelles de toxicité différentes pour mesurer les effets à court terme (aigus) du contact avec un produit chimique.

Les deux échelles les plus courantes dans le domaine de l'évaluation de la toxicologie professionnelle sont l'échelle de Hodge et Sterner (Tableau 1)[5] et celle de Gosselin, Smith et Hodge (Tableau 2)[6]. Dans ces tableaux, on emploie des cotes numériques et des descriptifs différents pour désigner chacune des classes de toxicité. Par exemple, un produit chimique jugé extrêmement toxique appartient à la classe 1 dans le tableau 1 et à la classe 5 dans le tableau 2. Un produit chimique ayant une DL_{50} orale de 2 mg/kg correspondrait à la classe 1 dans le tableau 1, et serait jugé "fortement toxique" tandis qu'il appartiendrait à la classe 6 et serait jugé "super-toxique" dans le tableau 2. Il est donc indispensable de préciser l'échelle qu'on utilise lorsqu'on dit qu'un produit chimique est légèrement toxique, modérément toxique ou extrêmement toxique.

La toxicité du produit chimique est inversement proportionnelle à la valeur de la DL_{50}: moins la DL_{50} est élevée plus le produit chimique est toxique, et vice versa. Il est important de souligner que la DL_{50} pour un même produit chimique peut varier selon qu'il est absorbé par voie orale, par la peau ou par inhalation. Prenons comme exemple les DL_{50} du dichlorvos, un insecticide qu'on emploie régulièrement dans les plaquettes insecticides domestiques. Voici les résultats de six épreuves de létalité différentes pour le dichlorvos[7]:

- DL_{50} orale (rat): 56 mg/kg
- DL_{50} orale (souris): 135 mg/kg
- DL_{50} orale (chien): 1 090 mg/kg
- DL_{50} dermique (rat): 75 mg/kg
- DL_{50} dermique (lapin): 107 mg/kg
- CL_{50} inhalation (rat): 1,7 ppm (15 mg/m^3); contact d'une durée de 4 heures.

Si l'on se reporte aux tableaux de classes de toxicité, la tableau 1 indique que le dichlorvos est modérément toxique pour le rat s'il est ingéré par voie orale (DL_{50} orale) et extrêmement toxique s'il est absorbé par les poumons (CL_{50} inhalation). Les différentes valeurs de la DL_{50} correspondent aux différents modes d'absorption du produit chimique.

La toxicité varie également en fonction des différents animaux. D'après les données ci-dessus, on constate que le dichlorvos administré par voie orale est beaucoup moins toxique pour les chiens que pour les rats ou les souris.

L'interprétation et l'application *suite*

Comment peut-on appliquer les données de la DL_{50} à l'homme? Les chercheurs ont pu établir à partir des nombreuses études régulières de DL_{50} que, règle générale, si la toxicité immédiate d'un produit chimique est la même pour tous les animaux mis en expérimentation, le degré de toxicité immédiate du produit sera probablement le même pour les humains[8,9]. Lorsque les valeurs de la DL_{50} varient d'un animal à l'autre ou lorsque les données sur les animaux sont lacunaires, on doit recourir à des approximations ou à des hypothèses pour estimer la dose létale probable pour les humains. Les tableaux 1 et 2 renferment une colonne donnant la dose létale estimative pour l'homme. On effectue des calculs spéciaux pour transformer les valeurs de la dose létale médiane chez les animaux en doses létales probables pour les humains. On incorpore habituellement dans ces calculs des facteurs de sécurité de l'ordre de 10 000 ou de 1 000 pour tenir compte des variations de la susceptibilité individuelle et des incertitudes qui peuvent entourer les résultats des expériences.

Tableau 1

Classes de toxicité
Échelle de Hodge et Sterner[5]

		Modes d'administration			
Classe de toxicité	Description courante	DL_{50} orale (Dose unique pour les rats) mg/kg	CL_{50} inhalation (Dose d'une durée de 4 heures pour les rats) ppm	DL_{50} dermique (Application unique à la peau de lapins) mg/kg	Dose létale probable pour les umains
1	Extrêmement toxique	1 ou moins	10	5 ou moins	1 grain (1 goutte, contact avec la bouche)
2	Fortement toxique	1—50	10—100	5—43	4 ml (1 cuillerée à thé)
3	Modérément toxique	50—500	100—1 000	44—340	30 ml (1 oz fluide)
4	Légèrement toxique	500—5 000	1 000—10 000	350—2 810	600 ml (1 chopine)
5	Très peu toxique	5 000—15 000	10 000—100 000	2 820—22 590	1 litre (1 pinte)
6	Relativement sans danger	15 000 ou plus	100 000	22 600 ou plus	1 litre (1 pinte)

Tableau 2

Classes de toxicité
Échelle de Gosselin, Smith et Hodge[6]

Classe de toxicité	Dose létale orale probable pour les humains — Dose	Pour une personne de 70 kg (150 lb)
6 super-toxique	moins de 5 mg/kg	1 grain (contact avec la bouche, moins de 7 gouttes)
5 extrêmement toxique	5—50 mg/kg	4 ml (entre 7 gouttes et 1 cuillerée à thé)
4 très toxique	50—500 mg/kg	30 ml (entre 1 cuillerée à thé et 1 oz fl.)
3 modérément toxique	0,5—5 gm/kg	30—600 ml (entre 1 oz fl. et 1 chopine)
2 légèrement toxique	5—15 gm/kg	600—1200 ml (entre 1 chopine et 1 pinte)
1 très peu toxique	plus de 15 gm/kg	plus de 1 200 ml (plus d'une pinte)

L'interprétation et l'application *suite*

Puisque la DL_{50} est une épreuve qui renseigne sur la toxicité à court terme d'un produit chimique, on peut s'en servir aux fins suivantes:

1. A titre informatif, pour élaborer les procédures d'urgence qu'il faut mettre en oeuvre en cas de déversement majeur ou d'un accident grave.

2. A titre informatif, pour élaborer des lignes de conduite régissant l'emploi de vêtements protecteurs et d'appareils appropriés. Par exemple, si la DL_{50} dermique d'un produit chimique révèle qu'il est extrêmement toxique, il est important que ceux qui le manipulent se couvrent la peau avec des vêtements, des gants ou d'autres protections adéquates faites d'un tissu résistant. Au contraire, si la concentration létale médiane par inhalation d'un produit chimique indique qu'il ne pose virtuellement pas de danger, on peut se dispenser de porter des masques protecteurs pour le manipuler.

3. Pour élaborer les règlements régissant le transport des produits chimiques visés en se fondant sur les facteurs 1 et 2 précités.

4. A titre informatif, pour établir les limites d'exposition admissibles dans le milieu de travail.

5. Les résultats peuvent figurer dans les fiches toxicologiques sur la sécurité des substances. A ce titre, la DL_{50} ne donne qu'une approximation grossière de la toxicité comparative. Elle ne

L'interprétation et l'application *suite*

renseigne absolument pas sur le niveau auquel le contact avec le produit chimique entraîne des effets toxiques bien que non létaux.

La DL_{50} n'est pas l'unique moyen d'évaluer la toxicité d'un produit chimique. Pour se faire une idée plus précise de la toxicité immédiate d'un produit chimique donné, on doit se munir d'informations supplémentaires telles que la dose toxique minimale, la vitesse à laquelle la personne atteinte peut se remettre des effets toxiques et le risque que la combinaison de produits chimiques produise des effets beaucoup plus graves que les composantes prises isolément.

L'avenir de la DL_{50}

Etant donné que les valeurs de la dose létale médiane (DL_{50} et CL_{50}) figurent dans bon nombre de règlements et de lignes directrices, on les emploie couramment et on leur accorde une grande importance pour évaluer la toxicité immédiate d'un produit chimique. Malgré l'emploi répandu de la dose létale médiane, les chercheurs formulent plusieurs critiques à l'endroit des épreuves de létalité. Ces épreuves nécessitent parfois un nombre élevé d'animaux d'expérience[10, 11]; les résultats ne sont pas facilement reproduits d'un laboratoire à l'autre[12, 13]; la mort de l'animal peut avoir des causes différentes dépendant de la dose, de la durée et de la fréquence des contacts avec le produit chimique. On reproche également à cette épreuve de ne représenter qu'un seul aspect de la toxicité du produit chimique[10,11,14,15].

On a suggéré d'autres approches expérimentales pour mieux décrire la toxicité des produits chimiques et pour réduire le nombre d'animaux mis en expérimentation. Entre autres, on a envisagé des variantes de l'épreuve DL_{50} qui consisteraient à modifier le nombre d'animaux en expérimentation ou en modifiant la procédure de dosage[11,12,16]. Par ailleurs, on a mis à l'essai des systèmes de modélisation par ordinateur et expérimenté sur des cellules animales ou humaines[11]. Plutôt que de provoquer délibérément la mort des animaux, on peut également donner des doses inférieures à la dose toxique et observer les effets sur les animaux en expérimentation[11].

Sommaire

Il est peu probable que les nouvelles approches qui ont été suggérées remplacent complètement la DL_{50}. Cette méthode est d'usage courant depuis les 50 dernières années et bénéficie d'un appui considérable. La DL_{50} fait partie des données d'évaluation fondamentales dans bon nombre de sommaires de toxicité chimique.

Elle a été adoptée à l'échelle internationale et incorporée dans des lois régissant la santé dans le milieu de travail, l'environnement, le transport et l'enregistrement des produits chimiques. Au point où nous en sommes, ce serait un travail gigantesque que de modifier les structures administratives en cause. Il semble bien qu'on continuera d'employer la DL_{50} au cours des années à venir en dépit de ses lacunes. On espère que ceux qui l'utiliseront tiendront compte de ses lacunes inhérentes et du fait qu'elle ne donne qu'une mesure partielle et, peut-être, d'une utilité limitée, de la toxicité des produits chimiques. On devrait accorder une plus grande importance à d'autres signes de toxicité tels que les maladies causées par de faibles doses.

Annexe

Autres types de doses toxiques employées couramment

DL_{01} Dose létale pour 1 pour cent de la population animale d'expérience.

DL_{100} Dose létale pour 100 pour cent de la population animale d'expérience.

$DL_{min.}$ La dose minimale provoquant la mort.

$DT_{min.}$ La dose minimale entraînant des effets toxiques.

Bibliographie

1. Trevan, J.W. The error of determination of toxicity. Proceedings of the Royal Society of London : Series B : biological sciences. Vol. 101 (1927). p. 483-514

2. Bliss, C.L. The calculation of the dose-mortality curve. Annals of Applied Biology. Vol. 22 (1935). p. 134-167

3. Litchfield, J.T.; Wilcoxon, F. Simplified method of evaluating dose-effect experiments. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Vol. 96 (1949). p. 99-113

4. Halton, D.M. Comment les matières chimiques du milieu de travail pénètrent dans l'organisme (P85-6F). Hamilton, Ontario : CCHST, 1985

5. Deichmann, W.B.; Gerarde, H.W. Toxicology of drugs and chemicals. New York : Academic Press, 1969

6. Gosselin, R.E.; Smith, R.P.; Hodge, H.C. Clinical toxicology of commercial products. 5th ed. Baltimore : Williams & Wilkins, 1984

7. Registry of toxic effects of chemical substances. NIOSH, Cincinnati OH. Vol. 2 (1979). p. 276

8. Ottoboni, M.A. The dose makes the poison : a plain language guide to toxicology. Berkely, CA : Vincente Books, 1984

9. Society of Toxicology of Canada. Position paper on the LD_{50}. Adopted at the STC Annual Meeting, December 3, 1985

10. Zbinden, G.; Flury-Roversi, M. Significance of the LD_{50}-test for the toxicological evaluation of chemical substances. Archives of Toxicology. Vol. 47 (1981). p. 77-99

11. Special Report: A new approach to the classification of substances and preparation on the basis of their acute toxicity. A report by the British Toxicology Society Working Party on Toxicity. Human Toxicology. Vol. 3 (1984). p. 85-92

12. Schültz, E.; Fuchs, H. A new approach to minimizing the number of animals used in acute toxicity testing and optimizing the information of test results. Archives of Toxicology. Vol. 51 (1982). p. 197-220

13. Blass, R.; Günzel, P.; Henschler, D.; König, J.; Lorke, D.; Neubert, D.; Schültz, E.; Shchuppan, D.; Zbinden, G. LD_{50} versus acute toxicity. Archives of Toxicology. Vol. 51 (1982). p. 183-186

14. Sperling, F. Non-lethal parameters as indices of acute toxicity : inadequacy of the acute LD_{50}. In: Advances in Modern Toxicology. Vol. 1, part 1. New concepts in safety evaluation. Eds. Mehlman, M; Shapiro, R.; Blumenthal, H. Halsted Press. John Wiley and Son, 1982. p. 177-191

15. Zbinden, G. Acute toxicity. In: Progress in Toxicology - Special topics. Vol. 1. New York : Springer, 1973. p. 23-27

16. Müller, H.; Kley, H.P. Retrospective study on the reliability of an "approximate LD_{50}" determined with a small number of animals. Archives of Toxicology. Vol. 51 (1982). p. 188-196